

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 39 531.4  
**Anmeldetag:** 23. August 2002  
**Anmelder/Inhaber:** Professor Dr. Erich Gulbins,  
Essen, Ruhr/DE  
**Bezeichnung:** Prophylaxe und Therapie von Infektionser-  
krankungen  
**IPC:** A 61 K 39/395

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 11. September 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Anmelder: Prof. Dr. Erich Gulbins  
Institut für Molekularbiologie  
Universität Essen  
Hufelandstraße 55  
  
45122 Essen

Unser Zeichen: P 41 949 DE

23. August 2002  
TM/GS/nw/ck

### Beschreibung

#### Prophylaxe und Therapie von Infektionserkrankungen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoffen, die zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten geeignet sind.

- 10 Da Infektionskrankheiten nach wie vor weltweit ein sehr großes medizinisches Problem darstellen, sind Studien zur Behandlung und zur Prophylaxe derartiger Erkrankungen schon lange Gegenstand intensiver Forschung. Beispielsweise werden ständig immense Kosten aufgewendet, um neue Antibiotika zu entwickeln. Diese Antibiotika sind notwendig, um Bakterien, Pilze, Protozoen oder Parasiten als Erreger von Infektionskrankheiten bekämpfen zu können. Insbesondere muß hierbei
- 15 den sich laufend neu entwickelnden Resistenzen der Erreger Rechnung getragen werden, was zunehmend problematischer wird.

- 20 Eine besondere Schwierigkeit stellt die Behandlung von Infektionskrankheiten dar, die durch Viren oder Prionen verursacht sind. Aufgrund eines fehlenden eigenen Stoffwechsels sind diese Erreger nicht mit Antibiotika

angreifbar, so daß im allgemeinen nur eine Behandlung der Symptome möglich ist.

Um die Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten zu verbessern und insbesondere den erwähnten Problemen Rechnung zu tragen, stellt sich die Erfindung die Aufgabe, Wirkstoffe bereitzustellen, die in besonderer Weise zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten geeignet sind.

10 Die Aufgabe wird gelöst durch eine Verwendung von Hemmstoffen, wie sie in Anspruch 1 und in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 10 beschrieben ist. Die Ansprüche 11 bis 13 betreffen entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

15

Erfindungsgemäß werden zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase und/oder Hemmstoffe von Produkten, die durch die von der sauren Sphingomyelinase katalysierte Reaktion entstehen, verwendet. Zu diesen Produkten

20 zählt insbesondere Ceramid, welches durch die Spaltung von Sphingolipiden entsteht. Versuche, die zu dieser neuen Verwendung von Hemmstoffen dieser Art geführt haben, zeigten, daß hierdurch die Infektion eukaryotischer Zellen mit verschiedenen pathogenen Organismen, beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, effektiv verhindert

25

werden kann.

Diese überraschenden Ergebnisse beruhen darauf, daß ceramidreiche Membranplattformen in der Zellmembran von eukaryotischen Zellen für eine Infektion eukaryotischer Zellen mit pathogenen Erregern notwendig

30 sind. Diese größeren Plattformen in der Zellmembran der eukaryotischen Zellen werden durch Fusion von sehr kleinen distinkten Domänen in der Zellmembran, sogenannten Rafts, gebildet. Diese Rafts bestehen

aus Cholesterol und Sphingolipiden, insbesondere Sphingomyelin, die sehr fest miteinander assoziieren, wodurch sie sich von den Phospholipiden der Zellmembran trennen und diese kleinen distinkten Domänen bilden.

5

Ergebnisse, die zur Erfindung führten, zeigten, daß diese kleinen Rafts durch das Enzym saure Sphingomyelinase und das durch die von diesem Enzym katalysierte Reaktion freigesetzte Ceramid zu den erwähnten größeren Plattformen fusioniert werden.

10

Eine physiologische Bedeutung dieser Plattformen wurde bereits kürzlich von Grassmé et al. beschrieben (J. Biol. Chem. 276, 20589-20596 (2001); J. Immunol. 168, 298-307 (2002)). Die Autoren konnten zeigen, daß diese ceramidreichen Plattformen der Vermittlung von Signalen aus

15 dem Extrazellulärraum in das Zellinnere dienen. Hierbei wird zunächst durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren, z. B. CD95 und CD40, eine Translokation des Enzyms saure Sphingomyelinase hin zur Außenseite der Membran induziert. Hier setzt die saure Sphingomyelinase aus Sphingomyelin Ceramid frei, das spontan in Rafts aggregiert. Dadurch

20 kommt es zur Transformation von Rafts in sehr hydrophobe Membranbereiche. Diese Ceramidaggregate zeigen weiterhin die Tendenz, spontan zu größeren Membranplattformen zu fusionieren. In diesen ceramidreichen Membranplattformen clustern aktivierte Rezeptoren wie CD95 und CD40, was für die Vermittlung eines Signals über diese Re-

25 zeptoren in die Zelle notwendig ist.

Interessanterweise konnte nun im Rahmen der Erfindung gezeigt werden, daß diese Plattformen zusätzlich ein Eindringen von pathogenen Organismen über diese entsprechenden Membranabschnitte ermöglichen. An der Bildung dieser „Eintrittstüren“ für pathogene Organismen in

30 die eukaryotische Zelle ist das Enzym saure Sphingomyelinase entscheidend beteiligt, da Ceramide als Produkte der von diesem Enzym

katalysierten Reaktion die Membranplattformen bilden. Ausgelöst wird dieser Vorgang dadurch, daß durch die Erreger über einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus die saure Sphingomyelinase dazu veranlaßt wird, in intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche bzw. in die

5 äußere Seite der Membran transportiert zu werden. Dort wird durch das Enzym der Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid in der Membran bewirkt.

Eine Aufgabe des Enzyms saure Sphingomyelinase wurde auch im Zusammenhang mit der Invasion von Gonokokken in eukaryotischen Zellen von Grassmé et al. beschrieben (Cell, Vol. 91, 605-615, 1997). Die Autoren konnten zeigen, daß die saure Sphingomyelinase an einer Signaltransduktionskette in der Wirtszelle beteiligt ist, welche die Invasion eines bestimmten Gonokokken-Stammes vermittelt. Entscheidend

10 sind hierbei bestimmte Oberflächenproteine auf dem bakteriellen Erreger, die sogenannten Opa-Proteine. Diese binden an einen spezifischen Rezeptor der eukaryotischen Wirtszelle, so daß eine Phospholipase C aktiviert und Diacylglycerol gebildet wird. Dieses Diacylglycerol aktiviert wiederum die saure Sphingomyelinase, so daß durch die von diesem

15 Enzym katalysierte Reaktion Ceramid gebildet wird. Diese Signalkaskade konnte jedoch nur durch ganz bestimmte Bakterien bzw. Stämme induziert werden. Insbesondere war die Induzierbarkeit dieser Signalkaskade abhängig von den Opa-Proteinen auf dem Bakterium. Es handelt sich hierbei also um einen völlig anderen, sehr speziellen Mechanismus

20 im Vergleich mit dem im Zusammenhang mit der Erfindung entdeckten generellen Invasions- bzw. Infektionsmechanismus über die besagten Membranplattformen.

Durch die erfindungsgemäße Verhinderung der Ausbildung der Membranplattformen und/oder der Zerstörung bereits gebildeter Membranplattformen wird ein Eindringen der Erreger in die Wirtszelle verhindert.

30 Dies wird im Rahmen der Erfindung vorzugsweise durch die Verwen-

- 5 dung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen der Produkte der von diesem Enzym katalysierten Reaktion erreicht. Dies hat gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden von Infektionskrankheiten den Vorteil, daß sich das Target für den Wirkstoff auf der Wirtszelle, also der zu infizierenden eukaryotischen Zelle, befindet. Durch die Erfindung wird ein genereller Infektionshemmer zur Verfügung gestellt, der für eine Vielzahl ganz unterschiedlicher pathogener Erreger eingesetzt werden kann (z. B. Bakterien, Viren, Parasiten, Protozoen oder Pilze). Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber
- 10 beispielsweise dem Einsatz von Antibiotika, die jeweils ganz spezifisch gegen den zu bekämpfenden Erreger gerichtet sein müssen. Durch die erfindungsgemäße Verwendung wird es nun auch möglich, gegen virale Infektionen vorzugehen, was bisher im allgemeinen in dieser Weise nicht möglich war. Zusätzlich wird durch die erfindungsgemäße Verwendung
- 15 das Problem von sich entwickelnden Resistenzen der pathogenen Erreger umgangen, da der Wirkstoff nicht gegen den Erreger selbst, sondern gegen die von diesem Erreger in der Wirtszelle ausgelösten Reaktionen gerichtet ist.
- 20 Von der Erfindung werden neben den Hemmstoffen, die direkt die Aktivität der sauren Sphingomyelinase beeinflussen, auch Wirkstoffe umfaßt, die Vorstufen des Enzyms und/oder Aktivierungsmechanismen des Enzyms beeinflussen. Weiterhin können die Wirkstoffe auch auf die Bildung, Stabilisierung, Mobilisierung und/oder Translokation der intrazellu-
- 25 lären Vesikel wirken, in denen sich das Enzym in der Zelle befindet.

- Zudem umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die die biologische Wirkung der Produkte, die durch die enzymatische Reaktion der sauren Sphingomyelinase entstehen, beeinflussen. Bei diesen Pro-
- 30 dukten handelt es sich insbesondere um Ceramid, welches einen wesentlichen Bestandteil der Membranplattformen bildet. Von der Erfindung umfaßt sind daher Hemmstoffe, die das Ceramid modifizieren und

insbesondere inaktivieren, neutralisieren oder zerstören. Weiterhin können die Hemmstoffe die Zusammenlagerung der Ceramide verhindern, so daß die Plattformbildung beeinträchtigt wird. Zusätzlich umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die die Funktionsfähigkeit der bereits gebildeten ceramidreichen Membranplattformen beeinflussen und/oder die Bildung der Membranplattformen von vornherein verhindern.

Als erfindungsgemäß geeignete Hemmstoffe kommen eine Vielzahl verschiedener Substanzen in Frage, beispielsweise Peptide, Proteine oder auch anorganische Substanzen. Weiterhin umfaßt die Erfindung auch Nukleinsäuren als Hemmstoffe, sofern sie gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung als Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase und/oder derer Reaktionsprodukte wirken. Beispielsweise sind hier Antisense-Moleküle der sauren Sphingomyelinase geeignet.

Vorteilhafterweise werden als Hemmstoffe pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt, von denen bekannt ist, daß sie das Enzym saure Sphingomyelinase hemmen. Besonders bevorzugt sind hierbei Antidepressiva, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva. Trizyklische Antidepressiva können beispielsweise einen proteolytischen Abbau des Enzyms bewirken, so daß das Enzym nicht mehr aktiv sein kann und eine Ceramidbildung verhindert wird. Durch diese Verminderung der Ceramidfreisetzung wird die Plattformbildung innerhalb der Zellmembran verhindert, so daß es nicht zu einer Infektion der Zelle kommt.

Als besonders vorteilhaft haben sich die Antidepressiva Amitryptilin und Imipramin erwiesen. Diese Antidepressiva sind daher für die erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt. Hierbei handelt es sich um bekannte pharmakologische Wirkstoffe (Generika), die im wesentlichen keine Nebenwirkungen entfalten. Für die erfindungsgemäße Verwen-

5      dung können diese Wirkstoffe in üblichen Darreichungsformen eingesetzt werden, insbesondere oral, intravenös, intramuskulär, topisch oder auch durch Inhalation. Weiterhin sind übliche Dosierungen für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet. Allerdings kann der erfindungsgemäße Effekt auch mit reduzierten Dosierungen erreicht werden.

10      Desweiteren umfaßt die Erfindung die Verwendung von Hemmstoffen, die von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleitet sind. Diese abgeleiteten Wirkstoffe weisen im wesentlichen die gleichen Effekte wie die Antidepressiva auf, können jedoch weitere vorteilhafte Eigenschaften besitzen. Vorteilhafterweise können diese Substanzen derart modifiziert sein, daß sie hydrophiler als die Ausgangssubstanzen sind. Dies bewirkt, daß die modifizierten Substanzen in geringerem Umfang im Gehirn angereichert werden, als es beispielsweise die Substanzen Amitryptilin und Imipramin tun. Bei diesen beiden genannten Substanzen kann  
15      eine Anreicherung im Gehirn nach einigen Wochen nachgewiesen werden. Weitere vorteilhafte Eigenschaften von abgeleiteten Stoffen können eine bessere Stabilität und/oder Bioverfügbarkeit sein.

20

    In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den Hemmstoffen um Antikörper, insbesondere um neutralisierende Antikörper. Diese Antikörper können sehr spezifisch mit dem Enzym saure Sphingomyelinase oder dessen Reaktionsprodukten, also  
25      insbesondere mit Ceramid, wechselwirken. Hierdurch wird die Aktivität des Enzyms bzw. die biologische Wirkung des Reaktionsproduktes beeinträchtigt und vorzugsweise gehemmt. Für die erfindungsgemäße Verwendung ist der Einsatz von Antikörpern als Hemmstoff sehr geeignet, da die Antikörper zum einen sehr spezifisch sind und Nebenwirkungen im allgemeinen vermieden werden. Als Antikörper für diese erfindungsgemäße Verwendung sind polyklonale und wegen ihrer besonderen Spezifität in bevorzugter Weise monoklonale Antikörper geeignet.  
30



Diese Antikörper können unterschiedlichen Ursprungs sein, besonders bevorzugt sind humanisierte Antikörper. Unter humanisierten Antikörpern sind Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu verstehen, die beispielsweise in Mäusen generiert werden. Durch Umklonierung muriner Sequenzen in humane Sequenzen wird ein Hybrid-Molekül erhalten, bei welchem alle murinen Teile (außer der variablen Domäne) durch humane Sequenzen ersetzt sind. Damit ist der resultierende Antikörper mit großer Sicherheit beim Menschen einsetzbar.

10 Bei der Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten kann es unter Umständen vorteilhaft sein, verschiedene der erfindungsgemäßen Wirkstoffe miteinander zu kombinieren.

15 Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist, daß sich die Angriffspunkte der Wirkstoffe (Hemmstoffe), also insbesondere die saure Sphingomyelinase bzw. Ceramid, an der Zelloberfläche befinden. Diese Targets sind also für die Wirkstoffe gut erreichbar, ohne daß es notwendig wäre, daß die Wirkstoffe in die Zellen hineintransportiert werden müßten. Dies könnte insbesondere bei größeren Wirkstoffen wie beispielsweise Antikörper ein Problem darstellen, welches sich vorteilhafterweise bei der erfindungsgemäßen Verwendung nicht stellt.

25 Bei den Infektionskrankheiten, die mit der erfindungsgemäßen Verwendung vorbeugend oder therapeutisch behandelt werden können, handelt es sich u. a. um virale, parasitäre und/oder mykologische Infektionskrankheiten. Weiterhin können auch Infektionskrankheiten behandelt werden, die durch Protozoen verursacht werden. Beispiele für derartige Infektionskrankheiten sind Aids, Hepatitis A, rhinovirale Erkrankungen, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Röteln, Influenza und/oder

30 Malaria. Weiterhin können auch bakterielle Infektionserkrankungen mit der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgreich prophylaktisch und/oder therapeutisch behandelt werden. Beispiele für derartige Erkrankun-

gen sind Tuberkulose und Meningokokken-Infektionen. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Verwendung auch mit Vorteil im veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt werden. Bei den hier zu behandelnden Infektionskrankheiten handelt es sich beispielsweise um Rinder- und/oder

5 Schweinepest.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen von Produkten der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion, insbesondere von Ce-

10 ramid, zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Verwendung wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

- 15 Die Erfindung umfaßt ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung enthält, der ein von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere ein von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleiteter Stoff ist. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zu-
- 20 sammensetzung, die mindestens einen Antikörper, insbesondere einen neutralisierenden Antikörper enthält, der gegen saure Sphingomyelinase gerichtet ist. Darüber hinaus umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen gegen Ceramid gerichteten Antikörper, insbesondere einen neutralisierenden Antikörper, enthält.
- 25 Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen außerdem jeweils mindestens einen pharmazeutischen Träger. Für die Herstellung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bzw. entsprechende Medikamente können übliche Methoden eingesetzt werden. Als Darreichungsformen sind beispielsweise Tabletten, Zäpfchen, Injektionslösungen
- 30 oder Infusionslösungen geeignet.

Die Erfindung umfaßt darüber hinaus ein Verfahren zur Hemmung von Infektionen eukaryotischer Zellen, insbesondere von Säugerzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die saure Sphingomyelinase und/oder Produkte der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion in ihrer Aktivität beeinflusst, insbesondere gehemmt, werden. Dieses Verfahren kann in vivo im intakten Organismus oder auch in kultivierten Systemen, beispielsweise in Zellkulturen oder Gewebekulturen, durchgeführt werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieses Verfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

10

Schließlich umfaßt die Erfindung die Behandlung von Infektionskrankheiten, wobei Hemmstoffe verabreicht werden, die das Enzym saure Sphingomyelinase und/oder Produkte der von diesem Enzym katalysierten Reaktion, insbesondere Ceramid, beeinflussen, vorzugsweise hemmen. Diese Behandlung erfolgt prophylaktisch und/oder während oder nach einer erfolgten Infektion. Eine vorbeugende Behandlung kann bei allgemeiner Infektionsgefahr oder bevorzugterweise bei einer akuten Infektionsgefahr durchgeführt werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Behandlung wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

20

Die genannten Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Beispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

25

In den Abbildungen zeigen:

30

Fig. 1: Die saure Sphingomyelinase (ASM) wird durch Infektion mit Rhinoviren aktiviert.

Fig. 2: Rhinoviren induzieren Ceramidfreisetzung.

Fig. 3: Amitryptilin und Imipramin hemmen dosisabhängig die Infektion menschlicher Zellen mit Rhinoviren.

5

Fig. 4: Die zytotoxische Wirkung von Rhinoviren wird durch Amitryptilin bzw. Imipramin gehemmt.

### Beispiele

10

a) Eine Infektion menschlicher Epithelzellen (Hela oder humane ex vivo Epithelzellen) aktiviert innerhalb von 10 bis 15 min. die saure Sphingomyelinase (ASM) um das Drei- bis Vierfache. Dies wurde am Beispiel von Hela-Zellen gezeigt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 zusammengefaßt. Die Zellen wurden mit Rhinoviren (Stamm 14, MOI von 25) infiziert und die Aktivität der Sphingomyelinase in Zel-

15 lysaten gemessen. Dazu wurden die Zellen nach der Infektion gewaschen, in 250 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1,3 mM EDTA und 0,05 % NP40 aufgenommen, durch Ultraschallbehandlung mit einem Stabsonicator bei niedriger Energie aufgebrochen und mit

20 [ $^{14}\text{C}$ ]Sphingomyelin (0,5  $\mu\text{Ci}/\text{Probe}$ , 54,5 mCi/mmol; NEN) für 30 min. inkubiert. Der in vitro Enzymassay wurde durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  einer 2:1-Mischung aus  $\text{CHCl}_3$  und  $\text{CH}_3\text{OH}$  (v/v) sowie 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  abgebrochen und die Freisetzung von [ $^{14}\text{C}$ ]Phosphoryl-

25 cholin in den wäßrigen Überstand durch organische Extraktion szintigraphisch gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

30

b) Die Stimulierung der sauren Sphingomyelinase korreliert mit einer Freisetzung von Ceramid aus den infizierten Zellen. Dies ist in Fig. 2 dargestellt. Hierfür wurden wiederum Hela-Zellen mit Rhinoviren (Stamm 14) infiziert. Die Messung von Ceramid erfolgte durch ei-

nen Diacylglycerol (DAG)-Kinase Assay (Grassmé et al., Cell 91, 605-615, 1997). Ceramid wurde durch Zugabe von DAG-Kinase und [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ ATP zu [ $^{32}\text{P}$ ]-Ceramid umgebaut. Das phosphorylierte Ceramid wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und szintigraphisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

c) Die Infektion menschlicher Epithelzellen mit Rhinoviren induziert die Bildung ceramidreicher Membranplattformen. Sowohl die saure Sphingomyelinase als auch Ceramid sind auf der Oberfläche in Membranplattformen, an die auch die Rhinoviren binden, nach einer Infektion zu finden. Als experimenteller Nachweis hierfür wurden humane nasale Epithelzellen mit Rhinovirusstamm 14 über 20 min. infiziert, fixiert und mit Cy3-markierten monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörpern (Alexis) gefärbt. Im Konfokalmikroskop zeigte sich kurze Zeit nach der Infektion die Bildung einer ceramidreichen Membranplattform. Nicht infizierte Zellen zeigten kein Ceramid auf der Zelloberfläche.

d) Eine pharmakologische Hemmung der sauren Sphingomyelinase blockiert die Infektion menschlicher Epithelzellen durch Rhinoviren dosisabhängig bis zu einer fast vollständigen Hemmung der Infektion. Als Pharmaka wurden die Antidepressiva Imipramin und Amitryptilin, die in Kontrolleexperimenten innerhalb von 20 min. bis zu 98 % der Aktivität der sauren Sphingomyelinase blockieren, verwendet. Die Infektion menschlicher Epithelzellen durch Rhinoviren wurde in durchflußzytometrischen Analysen des zytopathischen Effektes der Viren gemessen. Da Rhinoviren in diesen Zellen Zelltod induzieren, kann der Zelltod als Maß für eine Infektion der Zellen verwendet werden. Die Dosiswirkungskurve der Hemmung der Infektion menschlicher Epithelzellen durch Imipramin und Amitryptilin ist in Fig. 3 dargestellt. Hierfür wurden humane

Hela-Epithelzellen mit dem Rhinovirus-Stamm 14 für 24 h infiziert und die zytotoxische Wirkung der Viren durchflußzytometrisch nach Färbung mit FITC-Annexin gemessen. Amitryptilin bzw. Imipramin, die die saure Sphingomyelinase hemmen, wurden 30 min. vor Infektion der Rhinoviren in einem serumfreien Medium zu den Zellen gegeben. Die Daten zeigen, daß die Pharmaka die virale Infektion fast vollständig hemmen. Amitryptilin und Imipramin hatten selbst keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

e) Die zytotoxische Wirkung von Rhinoviren wird durch Amitryptilin bzw. Imipramin gehemmt. Fig. 4 zeigt die repräsentative durchflußzytometrische Analyse der Hemmung der Infektion von Hela-Zellen durch Rhinoviren nach Behandlung mit Amitryptilin. Hierfür wurden humane Hela-Epithelzellen mit verschiedenen Rhinovirus-Stämmen 24 h infiziert. Die Infektion wurde anhand der zytotoxischen Wirkung der Viren gemessen und durch Färbung der Zellen mit FITC-Annexin in einem Durchflußzytometer bestimmt. Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet einen Anstieg der FITC-Annexinbindung und ist damit ein Maß für Zelltod. Amitryptilin bzw. Imipramin als Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase wurden 30 min. vor Infektion mit den Rhinoviren zu den Zellen in einem serumfreien Medium zugegeben. Die Daten zeigen, daß die Pharmaka die virale Infektion fast vollständig hemmen. Gezeigt ist die Wirkung von Amitryptilin, analoge Daten wurden für Imipramin erhoben. Die linke Darstellung in Fig. 4 zeigt den Effekt ohne Wirkstoffzugabe, die rechte Darstellung den Effekt mit Wirkstoffzugabe.

f) Durch eine Behandlung von Hela-Zellen mit anti-Ceramid-Antikörpern wird eine Infektion der Zellen mit Rhinoviren nahezu

vollständig gehemmt. Für entsprechende Versuche wurden anti-Ceramid-Antikörper (Fa. Alexis) in einer Konzentration von 5 ng/ml mit den Viren (Rhinovirus-Stämme 2, 14 und 16) zu den Zellen gegeben. Die Infektion der Zellen mit den Rhinoviren wurde um

5

etwa 95% gehemmt.

-----

Patentansprüche

1. Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen von Produkten der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion, insbesondere von Ceramid, zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmstoffe Antidepressiva, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva sind.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antidepressiva Amitryptilin und/oder Imipramin sind.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmstoffe von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleitete Stoffe sind.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmstoffe Antikörper, insbesondere neutralisierende Antikörper, sind.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen die saure Sphingomyelinase gerichtet sind.
7. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen Ceramid gerichtet sind.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten virale, bakte-



rielle, parasitäre und/oder mykologische Infektionskrankheiten sind.

9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten Aids, Hepatitis A, rhinovirale Erkrankungen, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Röteln, Influenza, Tuberkulose, Meningokokken-Infektionen und/oder Malaria sind.
10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Infektionskrankheiten Rinder- und/oder Schweinepest sind.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines von trizyklischen und/oder tetrazyklischen Antidepressiva, insbesondere von Amitryptilin und/oder Imipramin, abgeleiteten Stoffes sowie einen pharmazeutischen Träger.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines gegen saure Sphingomyelinase gerichteten Antikörpers, insbesondere neutralisierenden Antikörpers, sowie einen pharmazeutischen Träger.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines gegen Ceramid gerichteten Antikörpers, insbesondere neutralisierenden Antikörpers, sowie einen pharmazeutischen Träger.

-----

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hemmstoffen der sauren Sphingomyelinase und/oder von Hemmstoffen von Produkten der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion zur Prophylaxe und/oder Therapie von Infektionskrankheiten. Bei den genannten Produkten handelt es sich insbesondere um Ceramid. Als Hemmstoffe sind in besonderer Weise neutralisierende Antikörper und/oder Antidepressiva bevorzugt, insbesondere trizyklische und/oder tetrazyklische Antidepressiva.

10

-----

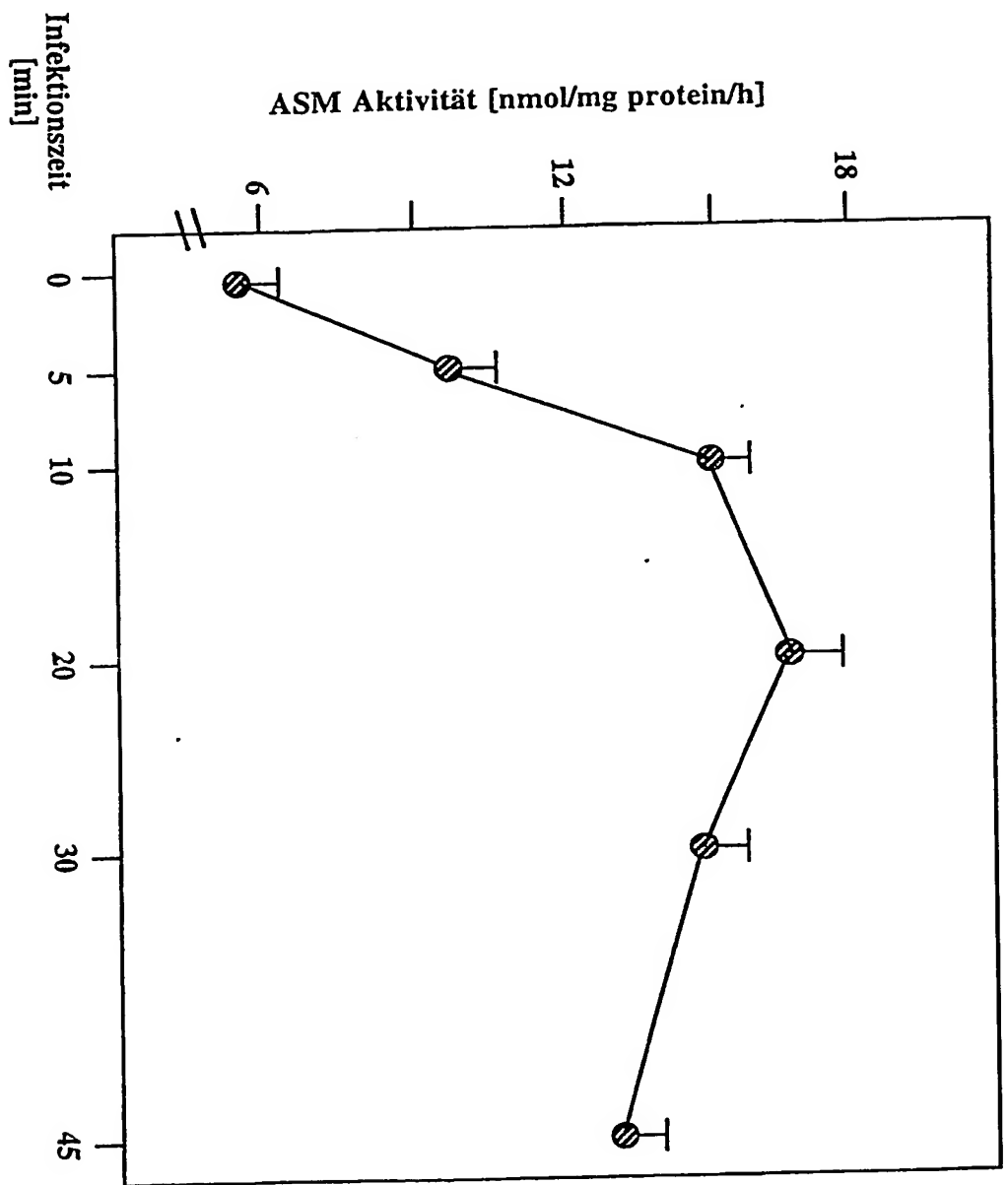


Fig. 1

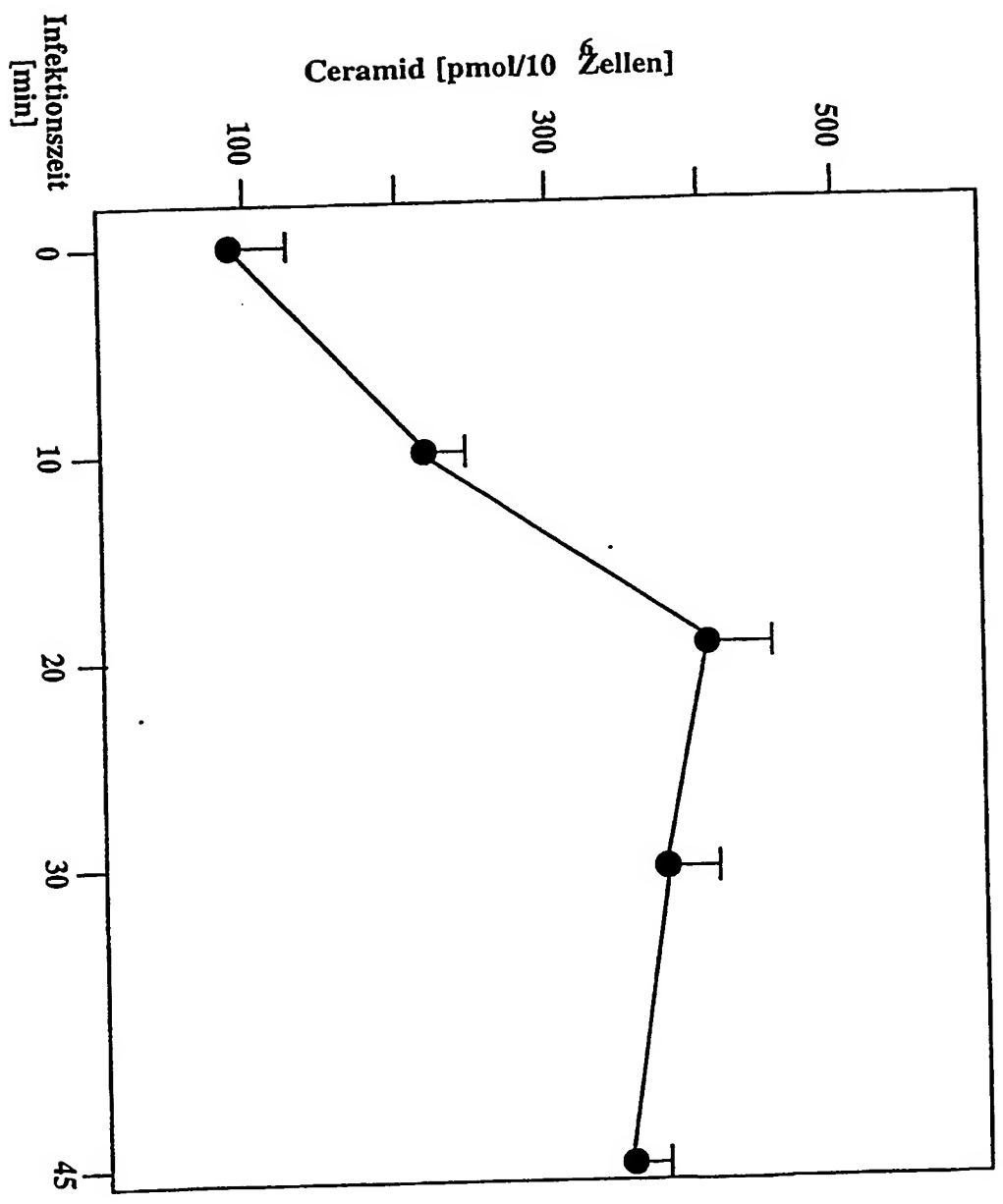


Fig. 2

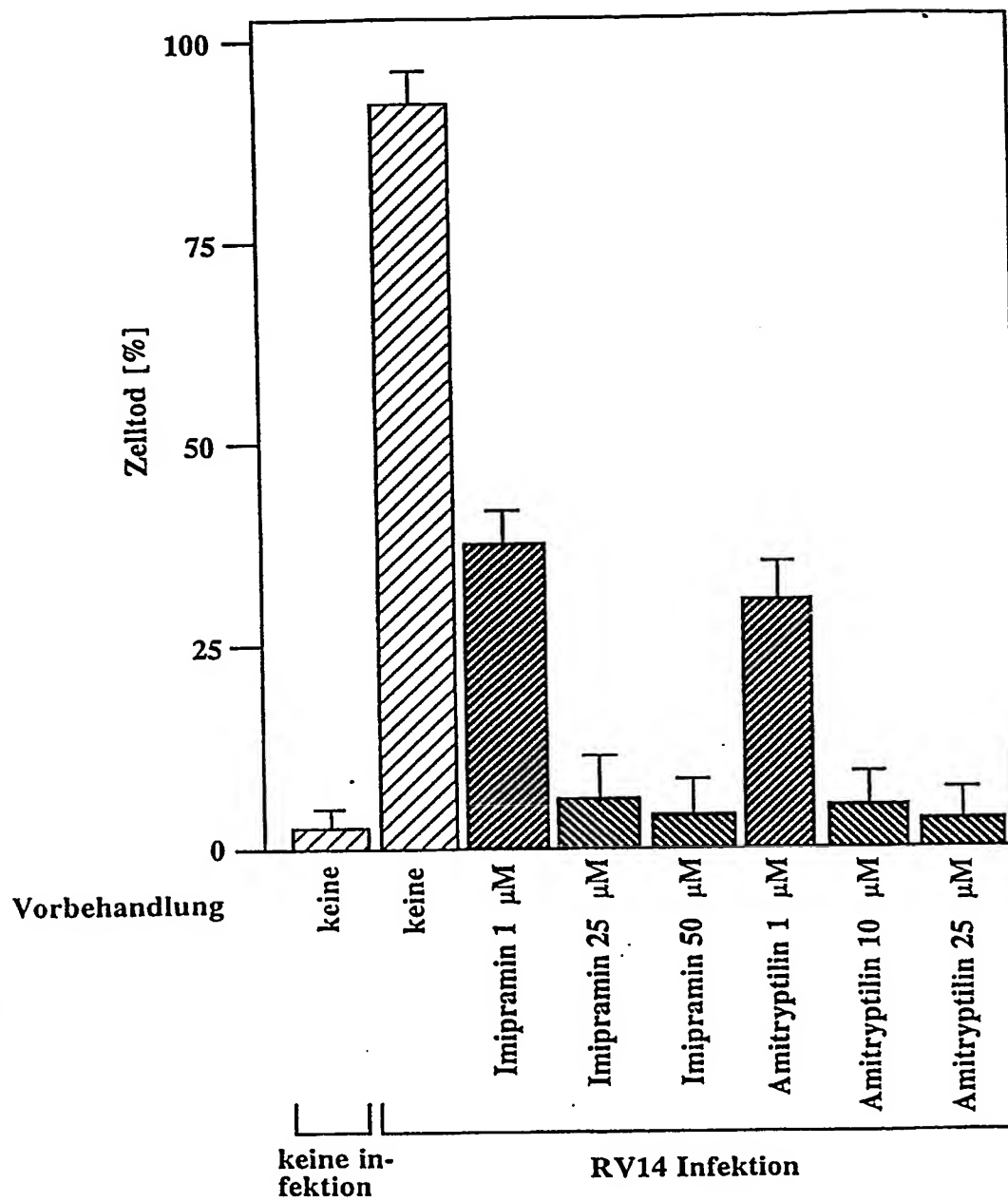


Fig. 3

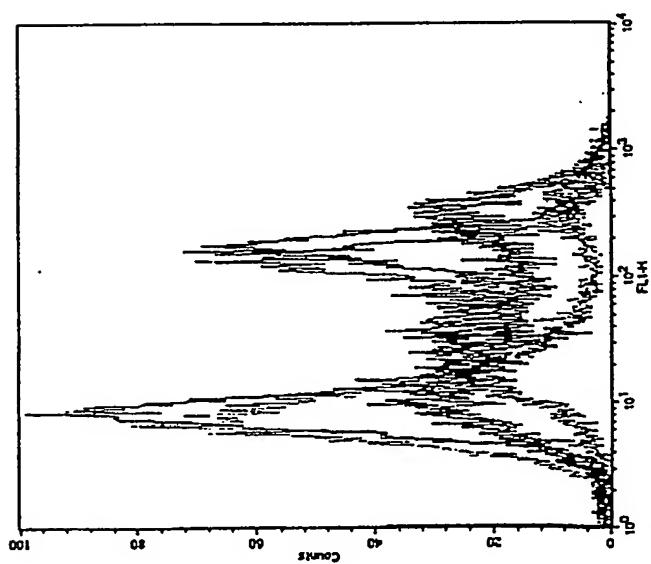
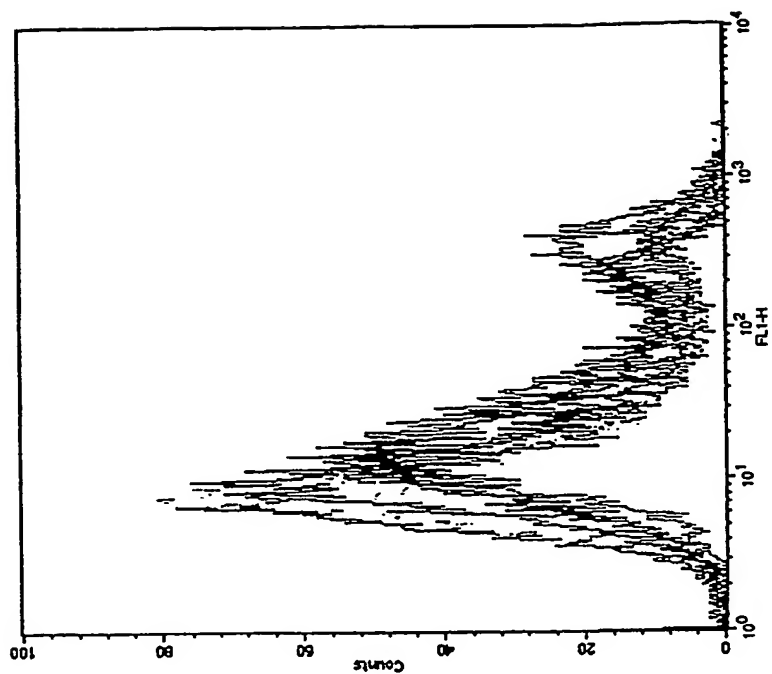


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**